

Péptidos como portadores penetrantes de células

- Esta invención está relacionada con los campos de la medicina, la investigación, el diagnóstico, y la cosmética, y específicamente con nuevos péptidos como portadores penetrantes de células para la administración de compuestos a las células.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- La pobre permeabilidad de la membrana celular a agentes externos es una limitación significativa en investigación y particularmente en medicina en el desarrollo de muchos fármacos. La eficiente internalización celular de muchos agentes químicos es todavía un reto.
- La Investigación en este campo ha tomado varias aproximaciones. Una primera aproximación conlleva el uso de promotores de penetración como agentes quelatadores, tensioactivos y no tensioactivos, sales biliares y ácidos grasos, que tienen buenos efectos en la penetración pero también problemas de seguridad. Una segunda aproximación conlleva el uso de tecnologías basadas en los liposomas, los vectores virales y la microinyección, pero todavía tienen poco éxito.

- La capacidad de ciertos péptidos para atravesar membranas celulares es de interés en este campo. Recientemente, este interés ha conducido a un rápido desarrollo de péptidos portadores para la administración de fármacos antitumorales, antivirales o antibióticos, que de otra manera serían incapaces de atravesar la membrana celular y alcanzar su diana terapéutica. El uso de péptidos portadores tiene la ventaja de permitir una síntesis accesible y una elevada flexibilidad para la modificación cuando se unen péptidos o moléculas pequeñas de fármaco como cargas. Se ha demostrado la capacidad de una gran variedad de péptidos cortos para actuar como portadores para la administración de otros péptidos, proteínas u oligonucleótidos dentro de la célula. Los ejemplos más destacados son la calcitonina humana (hCT), los fragmentos de dominios de transducción de proteínas como el VP22 (cfr. S.R. Schwarze et al., "Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?", Trend in Cell Biol. 2000, vol. 10, pp. 290-5), el transactivador VIH de transcripción, también conocido como "Tat" (cfr. M. Silhol et al., "Different

mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat", Eur. J. Biochem. 2002, vol. 269, pp. 494-501) o la Antennapedia, también conocida como "Antp" (cfr. D.J. Dunican et. al., "Designing cell-permeant phosphopeptides to modulate intracellular signaling pathways", Biopolymers Pept. Sci. 2001, vol. 60, pp. 45-60), péptidos ricos en arginina (cfr. J.B. Rothbard et al., "Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake", J. Med. Chem. 2002, vol. 45, pp. 3612-18; N. Eml et al., "Gene transfer mediated by polyarginine requires a formation of big carrier-complex of DNA aggregate", Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1997, vol 231, pp. 421-4), β-péptidos, peptoides y oligómeros (péptidos ramificados ricos en Lys). Se ha demostrado que todos estos péptidos penetrantes de células son valiosos en la administración de cargas biológicamente activas al citoplasma y al núcleo. Sin embargo, el principal inconveniente de estos péptidos es que son citotóxicos a concentraciones moderadas y elevadas. Además, el manejo en el laboratorio asociado al uso de estos péptidos es difícil.

Hace varios años se sintetizaron péptidos de fórmula general (Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro)_x, (utilizando códigos de aminoácido de tres letras) con x = 2-8 utilizando una aproximación convergente en fase sólida (cfr. I. Dalcol et al., "Convergent solid phase peptide synthesis: an efficient approach to the synthesis of highly repetitive domains", J. Org. Chem. 1995, vol. 60, pp. 7575-81). Pero no se ha descrito la capacidad de estos péptidos para formar complejos con fármacos u otros compuestos y para actuar como portadores capaces de translocar estos compuestos.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los Inventores proporcionan una nueva familia de péptidos que tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares y, por lo tanto, de actuar como portadores penetrantes de células de fármacos y/o otras moléculas. En particular, estos péptidos tienen una elevada eficiencia de penetración y no tienen efectos citotóxicos a concentraciones elevadas.

Así, un aspecto de la presente invención está relacionado con compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéutica o biológicamente aceptables, donde

Val es L-Val o D-Val; Arg es L-Arg, D-Arg o L-(N-metil)Arg; Pro es L-Pro o D-Pro; Leu es L-Leu o D-Leu; x es un entero del 1 al 20; L₁ y L₂ son conectores químicos, que son idénticos o diferentes, presentes o ausentes; M₁ y M₂ son grupos farmacéutica y/o biológicamente activos, que son idénticos o diferentes, presentes o ausentes; y el enlace entre L₁ y M₁ y el enlace entre L₂ y M₂ son de cualquiera de las naturalezas químicas conocidas, incluyendo covalente e iónica.

M₁-L₁-(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro)_x-L₂-M₂

(I)

La N-metilación en (N-metil)Arg ocurre en el grupo amino del esqueleto del aminoácido Arg, no en el grupo amino de la cadena lateral. Los aminoácidos que componen la secuencia peptídica pueden tener configuración L o D. La síntesis con aminoácidos de configuración D es más cara pero es útil para evitar la degradación del péptido por proteasas. La inclusión de al menos un aminoácido D en la secuencia peptídica es suficiente para conseguir la resistencia a las proteasas y, consiguientemente, para hacer a los péptidos utilizables en aplicaciones médicas.

Los compuestos de la invención pueden sintetizarse utilizando p.ej. las técnicas de síntesis en fase sólida, en fase líquida, o combinadas, como es conocido para un experto en la materia. Alternativamente, los péptidos pueden sintetizarse a partir de un ácido nucleico que codifique para el péptido. Este ácido nucleico puede introducirse en un sistema celular y expresarse para producir cantidades a gran escala del péptido.

Los compuestos según la presente invención representados por la fórmula (I) también pueden obtenerse por métodos conocidos en forma de sus sales farmacéutica y/o biológicamente aceptables, como la sal sódica, la sal potásica, la sal cálcica, la sal magnésica y sales de adición con ácidos. Ejemplos de las últimas sales incluyen las sales de ácidos inorgánicos (p.ej. ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico) y de ácidos orgánicos (p.ej. ácido acético, ácido propiónico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico y ácido metanosulfónico).

Los conectores químicos incluidos en la fórmula (I) pueden ser cadenas

alifáticas (p.ej. aminoácidos y polietilenglicol) o cadenas aromáticas. En una realización particular de la invención los conectores se seleccionan independientemente de secuencias de péptidos de hasta 10 residuos de aminoácidos. Se puede incluir en la fórmula (I) una gran gama de grupos que

5 tienen actividad farmacéutica y/o biológica. Los grupos pueden ser principios activos farmacéuticos, ácidos nucleicos (p.ej. oligonucleótidos, ADN de cadena doble, ADN de cadena simple, ADN circular, ARN y ARN de interferencia de señal - "signal interfering", siRNA -), ácidos nucleicos peptídicos ("PNAs"), nanopartículas, anticuerpos y marcadores o sondas

10 ambos radioactivos y fluorescentes (p.ej. carboxifluoresceína y derivados, amarillo lucifer, rodamina y rojo texas). Los grupos también pueden ser péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos o esteroides. Ejemplos de principios activos farmacéuticos son la dopamina, la doxorubicina, la daunomicina, el paclitaxel y péptidos y proteínas terapéuticas. Una composición para la

15 administración en células puede comprender más de un tipo de molécula, por ejemplo, dos secuencias de ADN diferentes.

Es bien conocido para aquellos expertos en la materia el cómo unir químicamente un péptido a un grupo y/o a un conector. Así, el enlace entre L_1

20 y M_1 y el enlace entre L_2 y M_2 puede ser de cualquiera de las naturalezas químicas conocidas, dependiendo de la naturaleza de L_1 , L_2 , M_1 , M_2 y de la naturaleza del péptido, incluyendo los enlaces covalente e iónico. Es importante que el enlace químico seleccionado mantenga la actividad del correspondiente grupo.

25 En una realización de la invención, el parámetro x de la fórmula (I) es del 1 al 10, más específicamente del 1 al 3, y preferiblemente 3. En otra realización, L_1 , L_2 , M_1 y M_2 están todos ausentes y, consecuentemente, el compuesto de fórmula (I) es (Val-Arg-Leu-Pro-Pro- Pro) $_x$, donde x es preferiblemente 3. En

30 una realización particular, los compuestos tienen una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1-6.

Otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de los péptidos de la presente invención como portadores penetrantes de células. Comparados

35 con otros péptidos portadores descritos previamente, los péptidos de la presente invención tienen muchas ventajas, incluyendo su origen no viral, su carácter anfipático, su solubilidad en agua y la ausencia de un efecto

citotóxico a concentraciones elevadas (más de 1000 μM). Otros péptidos como Antp o Tat son citotóxicos a concentraciones de 50 μM .

5 El término "portador" ("carrier") significa aquí cualquier sustancia utilizada para soportar o transportar otra sustancia. En esta invención, la 5(6)-carboxifluoresceína se utiliza como grupo para ilustrar el potencial de los nuevos péptidos para actuar como portadores penetrantes de células. En el ejemplo específico incluido, la 5(6)-carboxifluoresceína se administra a la línea celular humana HeLa. Sin embargo, los péptidos de la invención son
10 útiles para otros tipos de células eucariotas y también para células procariotas. En una aplicación particular, los portadores penetrantes de células de la invención son utilizables para actuar como agentes de transfección. El término "transfección" significa aquí el proceso de insertar ADN extraño en un cultivo de células eucariotas exponiéndolas a ADN
15 desnudo (análogo a la transformación en células procariotas).

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención, junto con cantidades apropiadas de excipientes farmacéuticos. Y
20 de la misma manera, la invención proporciona composiciones cosméticas que comprenden una cantidad cosméticamente efectiva de un compuesto de la invención, junto con cantidades apropiadas de excipientes cosméticos. La invención conlleva el uso de un solo péptido o una mezcla. El experto en la materia escogerá las vías de administración apropiadas para estas
25 composiciones, por ejemplo oral, parenteral, nasal o tópica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. El resumen de esta solicitud se incorpora aquí como
30 referencia. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes realizaciones particulares, los dibujos y la lista de secuencias se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

35

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1. muestra un esquema de la síntesis y la reacción de carboxifluoresceinación en soporte sólido (resina = resina 2-clorotritilo); a) 5(6)-carboxifluoresceína (5 eq), PyAOP (5 eq), HOAt (5 eq), DIEA (10 eq), DMF, 1h 30 min, t.a., b) 95% TFA, 2.5% TIS, 2.5% agua (15 min-1h 30 min). R significa "resina".

La FIG. 2. muestra los resultados del experimento en un lector de fluorescencia con microplacas. F significa "emisión de fluorescencia" en unidades de fluorescencia. La FIG. 2A representa la fluorescencia emitida después de incubar células HeLa durante 3h con CF-(Val-X-Leu-Pro-Pro-Pro)_n con X = Arg e His y n = 1-3 a una concentración 50 µM. La FIG. 2B es una representación comparativa de fluorescencia emitida obtenida después de incubar células HeLa durante 1h a 37 °C con varios péptidos carboxifluoresceinados a diferentes concentraciones en un rango de 5 µM a 50 µM.

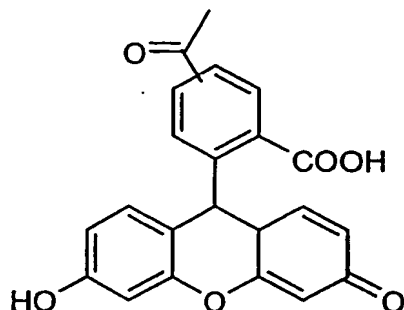
La FIG. 3 muestra los resultados del experimento de viabilidad y proliferación de HeLa. CV significa "viabilidad celular" en %. En la FIG. 3A la viabilidad celular fue cuantificada por tratamiento con MTT, después de incubar las células HeLa durante 24h con el péptido CF-(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro)₃ a altas concentraciones que variaban de 50 a 1000 µM. En la FIG. 3B la viabilidad de HeLa fue cuantificada por tratamiento con MTT, después de incubar las células durante 24h con CF-Tat-NH₂ y CF-Antp-NH₂ en una serie de concentraciones de 50 a 1000 µM.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

30 Síntesis peptídica

Los péptidos basados en (Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro) se sintetizaron para ser comparados con los péptidos basados en (Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro). Se realizó la síntesis de (Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro)_n y (Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro)_n, donde n = 1-3, mediante síntesis peptídica en fase sólida en una resina 2-clorotritilo. Este soporte evita la reacción secundaria de formación de dicetopiperacina PP. El compuesto 5(6)-carboxifluoresceína (CF) se utilizó

para la síntesis de los péptidos marcados fluorescentemente necesarios en estudios de internalización en células.



5 5(6)-carboxyfluoresceína (CF)

Materiales: Los aminoácidos Fmoc-protectados se adquirieron de Advanced Chem Tech. La resina 2-clorotritilo se compró a CBL Patras. Reactivos de acoplamiento: el hexafluorofosfato de

10 7-azabenzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio (PyAOP) se obtuvo de Applied Biosystems, la resina rink amide MBHA y el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio (PyBOP) se adquirieron de Novabiochem, el 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) se obtuvo de GL Biochem, el tetrafluoroborato de

15 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) y el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) se adquirieron de Albatros Chem Inc.

Disolventes: el ácido trifluoroacético (TFA), la piperidina, la dimetilformamida (DMF), el diclorometano (DCM) y el acetonitrilo se compraron a SDS. La 5(6)-carboxyfluoresceína (CF) se adquirió de Acros. La diisopropilcarbodiimida (DIC) y la N,N-diisopropiletilamina (DIEA) se adquirieron de Merck. El triisopropilsilano (TIS) se adquirió de Fluka.

Los péptidos fueron sintetizados siguiendo protocolos estándares de síntesis peptídica en fase sólida utilizando la estrategia

25 9-fluorenilmetoxycarbonil/tert-butil (Fmoc/tBu). Se utilizaron la resina 2-clorotritilo, los aminoácidos N α -Fmoc-protectados (2 eq)/TBTU (2 eq) o el PyBOP (2 eq) y la DIEA (6 eq). Las síntesis de (Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg)-NH₂ (Tat) y (Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys)-NH₂

(Antp) se realizaron automáticamente en un sintetizador peptídico Applied Biosystems 433A. Se utilizaron la resina rink amide MBHA (0.1 mmol, 128 mg, funcionalización inicial de la resina = 0.78 mmol/g), los aminoácidos N α -Fmoc-protectidos (10 eq), TBTU/HOBt 0.45 M y la DIEA 2 M en NMP en las reacciones de condensación. Como grupos protectores para las cadenas laterales de Arg e His, se eligieron el 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil (Pbf) y el tert-butiloxicarbonil (Boc). La escisión del grupo protector Fmoc se llevó a cabo por tratamiento con una solución de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min).

Se disolvieron en DMF/DCM 9/1, la 5(6)-carboxyfluoresceína (CF) (5 eq), el PyAOP (5 eq), el HOAt (5 eq) y la DIEA (10 eq) en DMF, preactivados durante 10 min y después añadidos a la péptido-resina y agitados durante 1h 30 min. Los péptidos marcados fueron escindidos de la resina con un tratamiento con un 1% de TFA en DCM durante 5 min y los péptidos (Val-X-Leu-Pro-Pro-Pro)_n o CF-(Val-X-Leu-Pro-Pro-Pro)_n (X es Arg o His) fueron obtenidos después de tratar la péptido-resina con un 95% de TFA, un 2.5% de TIS y un 2.5% de agua durante 1h o 2h dependiendo del grupo protector utilizado para las cadenas laterales. Se siguió un protocolo similar para obtener CF-Tat-NH₂ o CF-Antp-NH₂.

Caracterización de los péptidos: Los péptidos marcados fueron identificados a una λ = 443 nm en un RP-HPLC analítico [aparato detector fotodiode Waters 996 equipado con un módulo de separación Waters 2695, una columna Symmetry[®] (C18, 5 μ m, 4.6 x 150 mm) y el programa de cromatografía Millenium manager; flujo = 1 ml/min; gradiente = 5-100% B en 15 min (B = 0.036% TFA en acetonitrilo)]. Los péptidos carboxifluoresceinados fueron purificados en un RP-HPLC semipreparativo [detector de absorbancia dual λ Waters 2487 equipado con un Waters 2700, un controlador Waters 600, un colector de fracciones Waters, una columna Symmetry[®] (C18, 5 μ m, 30 x 100 mm) y el programa de cromatografía Millenium manager; flujo = 10 ml/min; gradiente = 5-20% D en 5 min; 20-70% D en 30 min; 70-100% D en 5 min (D = 0.1% TFA en acetonitrilo)]. Los productos finales fueron caracterizados por espectrometría de masas MALDI-TOF (Vogayer-DE RP MALDI-TOF, PE Biosystems con un láser de N₂ de 337 nm). La combinación de los valores experimentales de absorción de los diferentes péptidos carboxifluoresceinados obtenidos por UV a 490 y 443 nm y el análisis de los

aminoácidos permitió obtener la concentración exacta para cada muestra (cf. TABLE 1).

Cultivo de células y tratamientos peptídicos

5

Se estudiaron las propiedades comparativas de los péptidos marcados para atravesar la membrana celular con la línea celular humana HeLa. En primer lugar, se cuantificó el grado de internalización de los monómeros, dímeros y trímeros a una concentración de 50 μ M en células HeLa utilizando un experimento con un lector de fluorescencia para microplacas. Después se realizó un análisis dosis-respuesta, incubando células HeLa con los péptidos a diferentes concentraciones. La internalización celular de los nuevos péptidos fue también estudiada por microscopía de barrido láser confocal ("confocal laser scanning microscopy", CLSM).

15

Las células HeLa se adquirieron de ATCC. Se conservaron en medio de cultivo DMEM (1000 mg/ml glucosa) (Biological Industries) con un 10% de suero fetal de ternero ("Fetal Calf Serum", FCS), 2 mM de glutamina, 50 u/ml de penicilina y 0.05 g/ml de estreptomycin. Para los experimentos de microscopía confocal, se despegaron células HeLa exponencialmente crecientes de las botellas de cultivo utilizando una solución de tripsina-0.25% EDTA y la suspensión de células fue sembrada en una concentración de 21.4×10^3 células/cm² sobre cubres de vidrio, o en portas de vidrio divididos en 8-pozos Lab-TekTM o en placas de 96-pocillos (Nalge Nunc International). Los experimentos fueron realizados 24h después, cuando la confluencia era de aproximadamente 60-70%. Se disolvieron los compuestos carboxifluoresceinados en PBS y esterilizados con filtros de 0.22 μ m (Millex-GV, PVDF, Durapore, Millipore). Las disoluciones iniciales de péptidos y de 5(6)-carboxifluoresceína se diluyeron en medio de cultivo. Las células no adheridas fueron eliminadas en los lavados y las células adheridas fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ en medio DMEM con una concentración conocida de péptido durante 3h.

35

Microscopía confocal de barrido láser confocal (CLSM)

Después de 3h de incubación a 37 °C de las células HeLa con 5(6)-carboxifluoresceína (como control negativo) o con los péptidos

carboxifluoresceinados a una concentración de 50 μM , las células fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas en una solución de 3% p-formaldehído durante 15 min. Las células se lavaron con PBS durante 5 min y montadas con medio de montaje Mowiol. La CLSM se realizó con un microscopio confocal Leica SP2. Las imágenes se tomaron utilizando un objetivo de inmersión de aceite 63X/1.3 NA. Como control de fijación, se realizaron experimentos similares con células sembradas en cámaras con el fondo de vidrio Lab-TekTM para observaciones de células vivas. Después de una incubación de 3h, se lavaron las células tres veces con PBS con 1.1 mM de CaCl_2 y 1.3 mM de MgCl_2 y se tomaron las imágenes utilizando un objetivo 60X/1.4 NA en un microscopio confocal Olympus Fluoview durante los siguientes 30 min. En ambos microscopios confocales, la fluorescencia de la carboxifluoresceína fue excitada con la línea a 488-nm de un láser de argón y su emisión fue detectada en un rango de 515-530 nm. Los parámetros del microscopio se mantuvieron idénticos para cada péptido y dosis.

Las imágenes de microscopía confocal (imágenes no mostradas en esta descripción por la ausencia de color), revelaron una distribución vesicular intracelular de los péptidos fluorescentes. Los péptidos carboxifluoresceinados fueron localizados dentro de las células y no estaban adheridos a la membrana celular. Se examinó la influencia de la etapa de fijación con una solución de 3% de p-formaldehído, pues la etapa de fijación previa a la observación en un microscopio podría llevar a la presencia de artefactos en la entrada o podría cambiar la localización de la molécula portadora. Se observó in vivo y en células fijadas, una distribución punteada citoplásmica fuera del núcleo. La fijación con p-formaldehído no influyó en la entrada en células HeLa y no modificó la localización de los péptidos portadores.

30 Experimento con un lector de fluorescencia de microplacas

Para cada experimento, se sembraron y cultivaron 21.4×10^3 células/ cm^2 durante 24h. Después de una completa adhesión a la placa, se cambió el medio de cultivo. Las células fueron incubadas durante 1h o 3h a 37 °C en atmósfera de CO_2 con medio fresco con péptidos marcados con carboxifluoresceína o con carboxifluoresceína. Se lavaron las células con PBS. Las células se trataron con un tampón de lisis (0.1% de Triton X-100 en

50 mM Tris, pH 8.5) durante 30 min. Las medidas de fluorescencia emitida se realizaron después de 30 min de incubación con el tampón de lisis en un lector de fluorescencia con microplacas FL600 (Bio-Tek). La fluorescencia se midió a una $\lambda_{\text{excitación}} = 485/20$ nm y una $\lambda_{\text{emisión}} = 530/25$ nm. Se realizó un triplicado de cada concentración de péptido o carboxifluoresceína y se restó la fluorescencia emitida por los blancos (células con medio de cultivo y sin péptidos). El experimento se reprodujo tres veces.

Como muestra la FIG. 2A, las células incubadas con CF-(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro)₃ presentaron un mayor intensidad de fluorescencia. La naturaleza de los residuos hidrofílicos y específicamente la longitud del péptido mostraron tener un pronunciado efecto en la internalización (FIG. 2B).

15 Ensayo de toxicidad peptídica (ensayo MTT)

La viabilidad y proliferación de las HeLa en presencia de los péptidos se estudiaron utilizando una prueba con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (cfr. "MTT-cell proliferation assay" Cell Biology: A Laboratory Handbook, Academic Press, 1998, Second Ed. vol. 1; Y. Liu et al., "Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction", J. Neurochem. 1997 vol. 69 pp. 581-93).

Para cada experimento se sembraron 7×10^3 células/cm² en una placa de 96-pocillos (Nange Nunc) (100 µl/pocillo) e incubadas durante 24h. Para evitar saturación con el crecimiento celular, después de 24h de la incubación con el péptido, se utilizaron 7×10^3 células/cm² en el experimento de proliferación (en vez de 21.4×10^3 células/cm² sembradas en los experimentos previamente descritos). Después de una completa adhesión de las células a la placa, se aspiró el medio de cultivo. Los péptidos fueron añadidos en concentraciones crecientes de 50, 100, 500, y 1000 µM. Las células se incubaron durante 3h o 24h a 37 °C en atmósfera del 5% de CO₂. El MTT fue añadido 2h antes del tiempo de incubación final, es decir, después de 1h para las 3h de incubación y después de 22h para el tiempo de incubación de 24h en una concentración final por pocillo de 0.5 mg/ml. Las células con péptidos y el MTT se incubaron durante 2h más y entonces se eliminó el medio

aspirando. Se añadió isopropanol para disolver el formazan, unos cristales azul oscuro observados en los pocillos. La absorbancia fue medida a una $\lambda = 570$ nm, 30 min después de la adición de isopropanol. La viabilidad celular se expresó como porcentaje de la fracción de células tratadas con péptido respecto a las no tratadas utilizadas como control.

El péptido CF-(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro)₃ no fue citotóxico después de una incubación de 24h con las células HeLa a concentraciones de hasta 1000 μ M, lo cual destaca su potencial como portador (FIG. 3A). Se realizaron estudios de citotoxicidad comparativos con otros péptidos penetrantes de células ya conocidos. CF-Tat-NH₂ y CF-Antp-NH₂ fueron citotóxicos a concentraciones relativamente bajas. A la concentración utilizada en los estudios de internalización, es decir a 50 μ M, CF-Tat-NH₂ redujo la viabilidad celular hasta un 64% y CF-Antp hasta un 75% (FIG. 3B). La viabilidad de las células HeLa se redujo dramáticamente en presencia de CF-Tat-NH₂ o CF-Antp-NH₂ a concentraciones mayores (p.ej. a 40% y 11% respectivamente a 500 μ M). En comparación con CF-Tat-NH₂ o CF-Antp-NH₂, el grado de internalización de CF-(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro)₃ fue respectivamente 15 o 20 veces menor, sin embargo este último presentó ausencia de citotoxicidad.

TABLA 1. Características de los péptidos sintetizados. Todos los péptidos tienen aminoácidos con configuración L.

secuencias de los péptidos	referencia	M (calculada)	M (encontrada)	RT (min) Grad: 5-100% B
Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro	RN 121322-14-3 SEQ ID NO: 1	659	660 [M+H ⁺], 682 [M+Na ⁺]	4.82
CF-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro		1018	1018 [M+H ⁺], 1040 [M+Na ⁺]	7.46
(Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro) ₂	RN 132609-32-6 SEQ ID NO: 2	1297	1298 [M+H ⁺], 1321 [M+Na ⁺], 1337 [M+K ⁺]	5.53
CF-(Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro) ₂		1657	1658 [M+H ⁺]	7.10
(Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro) ₃	RN 129460-93-1 SEQ ID NO: 3	1358	1359 [M+H ⁺]	5.84
CF-(Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro) ₃		1716	2299 [M+H ⁺]	6.9
Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro	SEQ ID NO: 4	678	679 [M+H ⁺]	4.8
CF-Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro		1019	1037 [M+H ⁺]	7.57
(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro) ₂	SEQ ID NO: 5	1337	1338 [M+H ⁺]	5.55
CF-(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro) ₂		1695	1696 [M+H ⁺], 1718 [M+Na ⁺]	7.24
(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro) ₃	SEQ ID NO: 6	1997	1998 [M+H ⁺]	5.6
CF-(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro) ₃		2356	2356 [M]	7.02
(Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg)-NH ₂ (Tat-NH ₂)	RN 130244-88-1 SEQ ID NO: 7	1337	1338 [M+H ⁺]	2.32
CF-Tat-NH ₂		1697	1698 [M+H ⁺], 1720 [M+Na ⁺]	4.49
(Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys)-NH ₂ (Antp-NH ₂)	RN 214556-79-3 SEQ ID NO: 8	2244	2245 [M+H ⁺], 2267 [M+Na ⁺]	5.12
CF-Antp-NH ₂		2604	2605 [M+H ⁺], 2626 [M+Na ⁺]	6.12

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)

5 $M_1-L_1-(Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro)_x-L_2-M_2$
(I)

o su sal farmacéutica o biológicamente aceptable, donde

Val es L-Val o D-Val;

10 Arg es L-Arg, D-Arg o L-(N-metil)Arg;

Pro es L-Pro o D-Pro:

Leu es L-Leu o D-Leu:

x es un entero del 1 al 20:

L₁ y L₂ son conectores químicos, que son idénticos o diferentes, presentes o ausentes;

M₁ y M₂ son grupos farmacéutica y/o biológicamente activos, que son idénticos o diferentes, presentes o ausentes; y

el enlace entre L_1 y M_1 y el enlace entre L_2 y M_2 son de cualquiera de las naturalezas químicas conocidas, incluyendo covalente e iónica.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde los conectores químicos se seleccionan Independientemente de secuencias de péptidos de hasta 10 residuos de aminoácidos.

25 **3. Compuesto según la reivindicación 1, donde los grupos farmacéutica y/o biológicamente activos son principios activos farmacéuticos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, esteroides, nanopartículas, anticuerpos, marcadores o sondas.**

30 4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde x es del 1 al 10.

5. Compuesto según la reivindicación 4, donde x es del 1 al 3.

35 6. Compuesto según la reivindicación 5, donde x es 3.

7. Compuesto según la reivindicación 1, donde L₁, L₂, M₁ y M₂ están todos

ausentes y, consecuentemente, el compuesto de fórmula (I) es (Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro)_x.

8. Compuesto según la reivindicación 7, donde x es 3.

5

9. Compuesto según la reivindicación 7, que tiene una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1-6.

10

10. Uso del compuesto definido en cualquiera de la reivindicaciones 7-9 como portador penetrante de células.

15

11. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, junto con cantidades apropiadas de excipientes farmacéuticos.

12. Composición cosmética que comprende una cantidad cosméticamente efectiva del compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, junto con cantidades apropiadas de excipientes cosméticos.

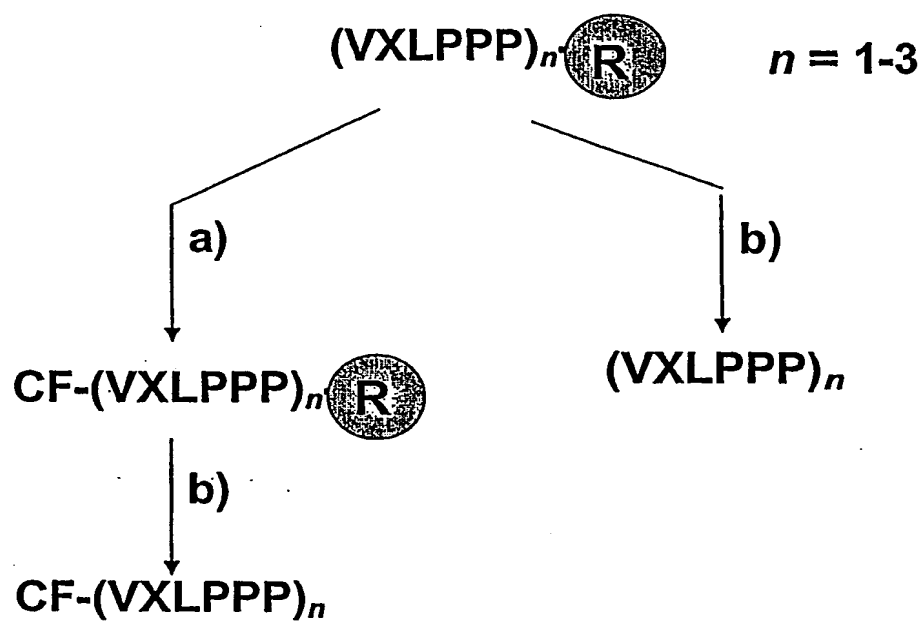
FIG. 1

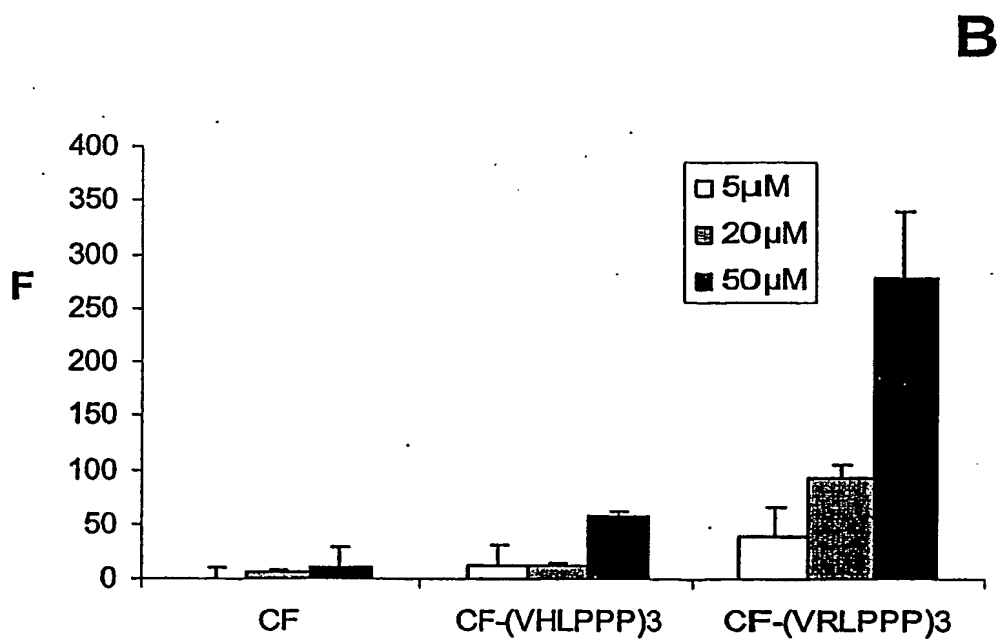
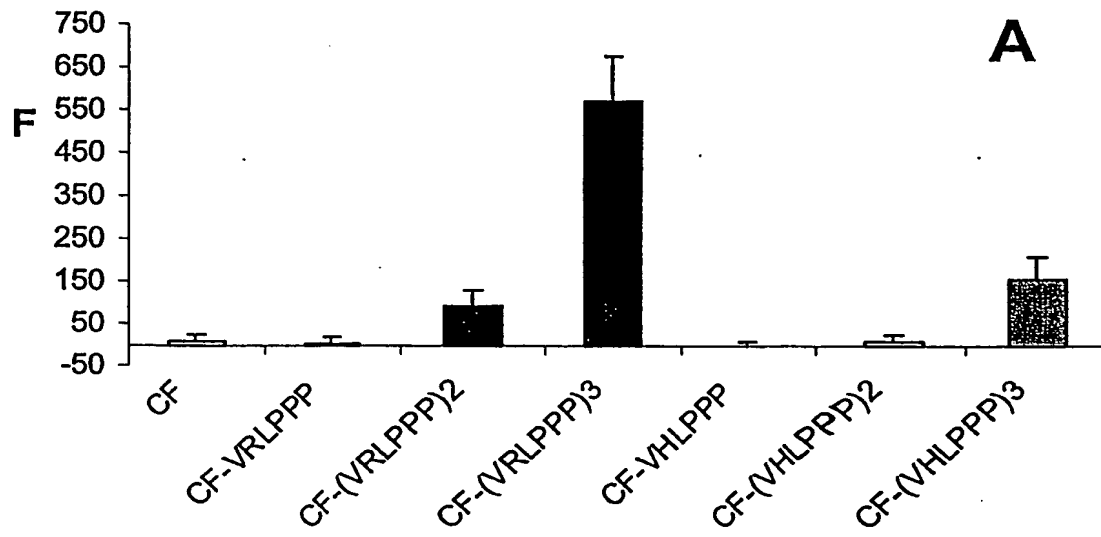
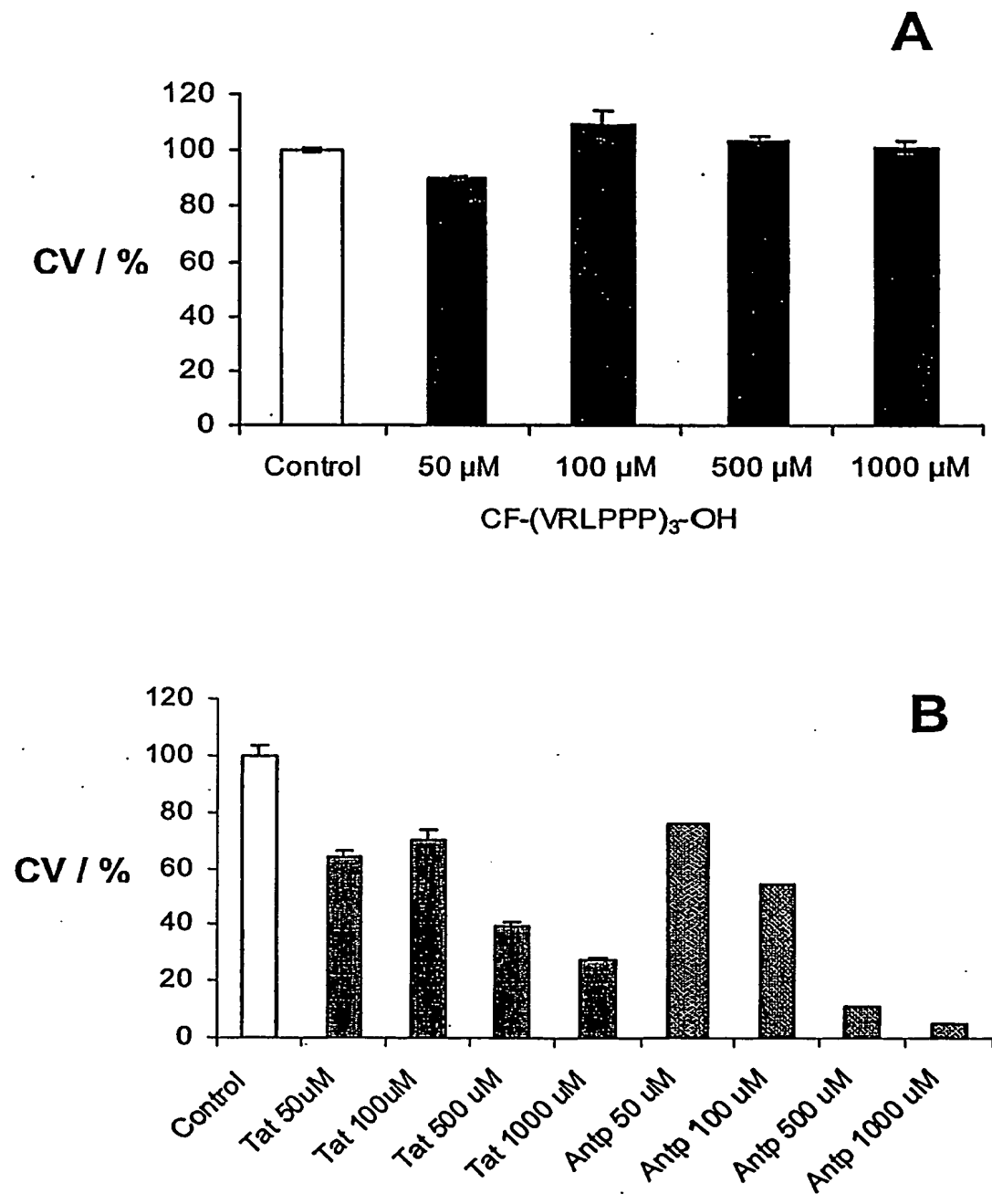
FIG. 2

FIG. 3

1
SEQUENCE LISTING

<110> Universidad de Barcelona
<120> Péptidos como portadores penetrantes de células
<130> WO-Giralt-1
<140> -----
<141> 2005-03-07
<150> ES 200400653
<151> 2004-03-08
<160> 8
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> peptide

<400> 1

Val His Leu Pro Pro Pro
1 5

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> peptide

<400> 2

Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro
1 5 10

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> peptide

<400> 3

Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro
1 5 10 15

Pro Pro

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> peptide

<400> 4

Val Arg Leu Pro Pro Pro
1 5

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> peptide

<400> 5

Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro Pro Pro
1 5 10

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> peptide

<400> 6

Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro
1 5 10 15

Pro Pro

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> peptide

<400> 7

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> peptide

<400> 8

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC' C07K 7/06, 7/08, A61K 38/08, 38/10, 47/42 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC' C07K, A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CIBEPAT, EPDOC, PAJ, REG, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
PX	FERNÁNDEZ-CARNEADO, J. et al. "Amphipathic peptides and drug delivery". BIOPOLYMERS (PEPTIDE SCIENCE). 8 March 2004. Vol. 76, pages 196-203, the whole document.	1-12		
PX	FERNÁNDEZ-CARNEADO, J. et al. " Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of -zein". ANGEW. CHEM. INT. ED. 26 March 2004. Vol. 43, pages 1811-1814, the whole document.	1-12		
PX	FOERG, C. et al. "Decoding the entry of two novel cell-penetrating peptides in HeLa cells: lipid raft-mediated endocytosis and endosomal escape". BIOCHEMISTRY. 12 August 2004. Vol. 44, pages 72-81, the whole document.	1-12		
X	CELMA, C. et al. "Optimization of the experimental procedures in fast atom bombardments mass spectrometry of peptides with a quadrupole mass spectrometer". BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL MASS SPECTROMETRY. 1990, Vol. 19, pages 235-239, see Fig 1.	9, 11, 12		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 14 June 2005 (14.06.2005)		Date of mailing of the international search report 16 June 2005 (16.06.2005)		
Name and mailing address of the ISA/ SPTO		Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CELMA, C. et al. "Determination of the enantiomeric purity of synthetic peptides by gas chromatography-mass spectrometry". JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. 1991, Vol. 256, pages 447-458, see Fig 1.	9, 11, 12
X	JP 2036127 A (AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL. et al.) 06.02.1990, (abstract) [on line] [retrieved on 10.06.2005]. Retrieved from EPO PAJ Database.	9, 11, 12
A	WO 03078470 A (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) 25.09.2003, the whole document.	1-12

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: Claims 1-7 (in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Formula I covers so many possible compounds that it is not possible to carry out a complete search. The search was limited to the compounds actually obtained (SEQ ID NOs:1-6) and which are shown in the examples.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-12 (in part): peptides of SEQ ID NOs:4-6, the use thereof as cell-penetrating carriers, pharmaceutical composition, cosmetic composition.

Invention 2: claim 10 (in part): use of the peptides of SEQ ID NOs:1-3 in the preparation of drugs/cosmetics and which act as cell-penetrating carriers.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2036127 A	06.02.1990	JP 2805032 B	30.09.1998 30.09.1998 30.09.1998
WO 03078478 A1	25.09.2003	AU 2003220040 A1 US 2005119429 A1	29.09.2003 02.06.2005

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUDCIP⁷ C07K 7/06, 7/08, A61K 38/08, 38/10, 47/42

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C07K, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, PAJ, REG, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
PX	FERNÁNDEZ-CARNEADO, J. et al. "Amphipathic peptides and drug delivery". BIOPOLYMERS (PEPTIDE SCIENCE). 8 de marzo de 2004. Vol. 76, páginas 196-203, todo el documento.	1-12
PX	FERNÁNDEZ-CARNEADO, J. et al. " Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of -zein". ANGEW. CHEM. INT. ED. 26 de marzo de 2004. Vol. 43, páginas 1811-1814, todo el documento.	1-12
PX	FOERG, C. et al. "Decoding the entry of two novel cell-penetrating peptides in HeLa cells: lipid raft-mediated endocytosis and endosomal escape". BIOCHEMISTRY. 12 de agosto de 2004. Vol. 44, páginas 72-81, todo el documento.	1-12
X	CELMA, C. et al. "Optimization of the experimental procedures in fast atom bombardments mass spectrometry of peptides with a quadrupole mass spectrometer". BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL MASS SPECTROMETRY. 1990, Vol. 19, páginas 235-239, ver Fig. 1.	9, 11, 12

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

14 Junio 2005 (14.06.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

16 JUN 2005

16.06.2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 3495552

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	CELMA, C. et al. "Determination of the enantiomeric purity of synthetic peptides by gas chromatography-mass spectrometry". JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. 1991, Vol. 256, páginas 447-458, ver Fig.1.	9, 11, 12
X	JP 2036127 A (AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL. et al.) 06.02.1990, (resumen) [en línea] [recuperado el 10.06.2005]. Recuperado de EPO PAJ Database.	9, 11, 12
A	WO 03078470 A (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) 25.09.2003, todo el documento.	1-12

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17(2)(a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☒ Las reivindicaciones n^{os}: 1-7 (parcialmente)
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
La fórmula I, cubre tantos compuestos posibles, que una búsqueda completa es imposible. La búsqueda se ha limitado a los compuestos realmente obtenidos (SEQ ID n° 1-6) y que se presentan en los ejemplos.

3. ☐ Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Invención 1: Reiv. 1-12 (parcialmente): péptidos de SEQ ID n°s 4-6, su uso como portadores penetrantes de células, composición farmacéutica, composición cosmética. Invención 2: Reiv. 10 (parcialmente): uso de los péptidos de SEQ ID n°s 1-3, en la preparación de medicamentos/cosméticos y que actúan como portadores penetrantes de células.

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales una protesta por parte del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

Formulario PCT/ISA/210 (anexo_familia de patentes) (Abril 2005)